

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14318 A2

(51) Internationale Patentklassifikation?: C07C 237/00 (74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08118 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 2000 (20.08.2000) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Einreichungssprache: Deutsch (30) Angaben zur Priorität:
199 40 130.6 24. August 1999 (24.08.1999) DE

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): PROBIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE). HOFFMANN, Torsten [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06114 Halle (DE). HEISER, Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NEW EFFECTORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV FOR TOPICAL USE

(54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN DER DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ZUR TOPISCHEN ANWENDUNG

B

(I)

WO 01/14318 A2

(57) Abstract: The invention relates to compounds of general formula (I), wherein A represents an amino acid with at least one functional group in the side chain; while B is a chemical compound covalently bound to a functional group of the side chain of A, namely oligopeptide with a chain length of up to 20 amino acids with the exception of glycine homopolymers which have up to 6 glycine monomers or polyethylene glycols with molar masses of up to 20000 g/mole; C represents a thiazolidine, pyrrolidine, cyanopyrrolidine, hydroxyproline, dehydroproline or piperidine group which is amide bonded. These compounds can be used to topically influence the activity of dipeptidyl Peptidase IV.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wobei A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist, B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an eine funktionelle Gruppe der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren ausser Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren oder Polyethylenglycole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt. Diese Verbindungen können zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl Peptidase IV eingesetzt werden.

NEUE EFFEKTOREN DER DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ZUR TOPISCHEN AN-WENDUNG

10 Die Erfindung betrifft neue Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV. Diese Effektoren können zur gezielten Beeinflussung lokal begrenzter pathophysiologischer und physiologischer Prozesse (Entzündungen, Chemotaxis, Autoimmunerkrankungen, Wundheilung) eingesetzt werden. Dabei werden die enzymatische Aktivität und die Bindungsaktivitäten der Dipeptidyl Peptidase IV und von Enzymen mit vergleichbarer oder identischer Aktivität sowie von Proteinen mit verwandter Primärstruktur (z. B. FAP, Fibroblast Activation Protein (Levy et al., 1999)) mittels Effektoren (Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren, Antikörpern, Bindungsproteine, Bindungsantagonisten, Bindungsagonisten u.a.) beeinflußt.

15

20 Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind (Kirschke et al., 1995) Kräusslich and Wimmer, 1987). Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalininasen entdeckt worden (Gomez et al., 1988)(Ansorge et al., 1991).

25 Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolin-spezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert (Yaron and Naidor, 1993); (Vanhoof et al., 1995). Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem es sie vor Abbau durch

unspezifische Proteasen schützt (Kessler, 1982). Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophylin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist (Ishiura *et al.*, 1989); (Hegen *et al.*, 1990).

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die lysosomale DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf sowie in nahezu allen Organen vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation der biologischen Aktivität von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist (Vanhoof *et al.*, 1995).

Kürzlich wurde gezeigt, daß eine Reihe von Chemokinen (RANTES, SDF-1alpha, MDC, Eotaxin u.a.) Substrate der DP IV sind und diese durch DP IV in ihrer Funktion moduliert werden (Proost *et al.*, 1998; Proost *et al.*, 1998; Proost *et al.*, 1999); (Shioda *et al.*, 1998)). Chemokine sind durch ihre chemotaktische Wirkung wesentlich an der Regulation lokaler immunologischer Vorgänge, wie Autoimmunprozesse, Enzündungen und Wundheilung beteiligt (Nelson and Krensky, 1998). In neueren Arbeiten konnte von uns nachgewiesen werden, daß auch biologisch aktive Peptide mit Serin oder Threonin in P₁-Position (Glukagon, VIP, PACAP) Substrate der DP IV darstellen.

Eine Reihe von biologisch aktiven DP IV-Substraten (Substanz P, Somatostatin, VIP, PACAP u.a.) sind an der Regulation von neuronalen, immunologischen und vasoaktiven Prozessen in der Haut beteiligt (Scholzen *et al.*, 1998); (Wallengren, 1997). Die Dipeptidyl Peptidase IV stellt somit eine wichtige Schaltstelle bei der Regulation der Aktivität gastrointestinal, immunologisch bzw. neurologisch aktiver Peptide und damit ein interessantes therapeutisches Target dar (Augustyns *et al.*, 1999). Die genauen Signalkaskaden sind im einzelnen jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Genauere Kenntnisse existieren über die Rolle der DP IV bei der Regulation der Blutzuckers. Durch limitierte Proteolyse werden die Inkretine GIP₁₋₄ und GLP-1₇₋₃₇ inaktiviert. Eine Hem-

mung der Plasma-DP IV-Aktivität führt über eine verlängerte Aktivität der Inkretine und eine verstärkte Insulinfreisetzung zu einer Normalisierung des Blutzuckerspiegels (Demuth *et al.*, 1996; Pauly *et al.*, 1999; Pauly *et al.*, 1996).

Die Rolle die DP IV im Immunsystem ist noch nicht vollständig geklärt. Sie ist ein Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten sowie ein Rezeptor für die Adenosindeaminase. Der Einsatz von DP IV-Inhibitoren hat in der Zellkultur und *in vivo* immunsuppressive Effekte (Ansorge *et al.*, 1995; Reinhold *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1992). Mit monoklonalen Antikörpern gegen CD26 wurden zum Teil unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Enzyms stimulatorische Effekte auf intrazelluläre Signalkaskaden (Ca^{2+} -influx, Kinaseaktivierungen) erzielt (Hegen *et al.*, 1993; Kameoka *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1993; Kähne *et al.*, 1995).

Aus der N-terminalen Sequenz der Substanz P abgeleitete Lysyl-Prolyl-Analoga zeigten einen fördernden Effekt auf die Wundheilung, der auf die Strukturähnlichkeit zu Substanz P zurückgeführt wird. Systemisch eingesetzte irreversible DP IV-Inhibitoren führten dagegen zu einer Hemmung der Wundheilung (Buntrock *et al.*, 1988; Kohl *et al.*, 1991; Kohl *et al.*, 1989).

Neben der Anwendung von DP IV- Inhibitoren zur Normalisierung der Blutglukose wurden DP IV-Inhibitoren bisher systemisch für die Behandlung von Arthritis im Tiermodell eingesetzt.

Bei Arthritis-Patienten sowie in tierischen Arthritismodellen wurde eine Verringerung der DP IV-Aktivität beobachtet (Küllertz and Boigk, 1986) (Fujita *et al.*, 1992). Insbesondere durch orale oder subkutane Applikation von systemisch wirkenden DP IV Inhibitoren wurde im Tiermodell eine Unterdrückung der Alkyldiamin-induzierten Arthritis erreicht (Tanaka *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998).

Auch im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen wurde eine Wirkung durch DP IV-Inhibitoren erzielt. So konnte durch DP IV-Inhibierung eine Unterdrückung der Proliferation von ‚myelin basic protein‘-spezifischen T-Zell-Klonen erreicht werden (Reinhold *et al.*, 1998).

Bei verschiedenen Hautkrankheiten (Psoriasis, Lichen planus) und kanzerogenen Erkrankungen der Haut konnte eine erhöhte DP IV-Aktivität in Keratinozyten und Fibroblasten nachgewiesen werden (Novelli *et al.*, 1996) (Raynaud *et al.*, 1992). Auch das eng mit DP IV verwandte ‚fibroblast-activation protein‘, das ca. 50 % Sequenzhomologie zur DP IV aufweist und wahrscheinlich mit der durch Piñeiro-Sánchez *et al.*, 1997 beschriebenen Seprase identisch ist, wird verstärkt von inaktivierte Fibroblasten von Epithelkarzinomen und heilenden Wunden exprimiert (Niedermeyer *et al.*, 1998).

Auf Grund der weiten Verbreitung des Proteins im Organismus und der vielfältigen Mechanismen in die DP IV, DP IV-Aktivitäten und DP IV-verwandte Proteine involviert sind, kann eine systemische Therapie (enterale oder parenterale Applikation) mit DP IV-Inhibitoren zu einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen führen. So greift eine parenterale oder enterale Applikation von DP IV-Inhibitoren regulierend bzw. deregulierend in den Glukosestoffwechsel ein.

Es konnte nun gezeigt werden, daß Seitenketten-modifizierte Substrate des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV durch das Enzym erkannt und wie unmodifizierte Substrate gespalten werden können.(DEMUTH, H.-U., HEINS, J., 1995).

10 So konnte z.B. gezeigt werden, daß phosphorylierte Dipeptid-(B)-*p*-nitroanilide [KASPARI, A., et al., 1996] Substrate der DP IV sind. DP IV-Inhibitoren wie z.B. Glu(Gly)-Thia oder Lys(Z-NO₂)-Thia [REINHOLD, D., et al., 1998] werden vollständig transportiert.

15 Die zu lösende Aufgabe bestand darin, Verbindungen herzustellen, die zur gezielten Beeinflussung lokal begrenzter pathophysiologischer und physiologischer Prozesse eingesetzt werden können. Insbesondere besteht die Aufgabe darin, eine lokal begrenzte Hemmung von DP IV bzw. DP IV-analoger Aktivität zu erzielen, um damit gezielt in die Regulation der Aktivität von lokal wirksamen Peptidhormonen eingreifen zu können.

20 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Verbindungen der allgemeinen Formeln A-C gelöst, wobei

B

25 A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist,

B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich

30 - Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren, außer Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren, oder
- Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, und

C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt.

Insbesondere wird erfindungsgemäß mindestens eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit-
5 gestellt, die

mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formeln A-C, wobei

B

10

A eine Aminosäure, vorzugsweise eine α -Aminosäure, besonders bevorzugt eine natürliche α -Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette, vorzugsweise Threonin, Tyrosin, Serin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Cystein ist,

15 B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren, Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, gegebenenfalls substituierte organische Amine, Amide, Alkohole, Säuren oder Aromaten mit 8 bis 50 C-Atomen,

20

C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt,

sowie

25

mindestens ein auf den Wirkort abgestimmtes übliches Adjuvans enthält.

Ferner werden derartige Verbindungen bzw. pharmazeutische Zusammensetzungen zur topischen Beeinflussung insbesondere der Verringerung der Aktivität von Dipeptidyl-Peptidase

30 IV oder analoger Enzyme verwendet.

In der gesamten Beschreibung und den Ansprüchen kann der Ausdruck "Alkyl" eine C₁-50 Alkylgruppe, bevorzugt eine C₆-30 Alkylgruppe, vorzugsweise eine C₈-12 Alkylgruppe darstellen; so kann eine Alkylgruppe z.B. eine Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl- oder Butylgruppe sein;

5 ist der Ausdruck "Alk" z.B. in dem Ausdruck "Alkoxy" und der Ausdruck "Alkan" z.B. in dem Ausdruck "Alkanoyl" wie "Alkyl" definiert;

sind Aromaten bevorzugt substituierte oder gegebenenfalls unsubstituierte Phenyl-, Benzyl-, Naphthyl-, Biphenyl- oder Anthracengruppen, die vorzugsweise mindestens 8 C-Atome

10 aufweisen;

kann der Ausdruck "Alkenyl" eine C₂-10 Alkenylgruppe, vorzugsweise eine C₂-6 Alkenylgruppe darstellen, die die Doppelbindung(en) an beliebiger Stelle aufweist und unsubstituiert oder substituiert sein kann;

15

kann der Ausdruck "Alkinyl" eine C₂-10 Alkinylgruppe, vorzugsweise eine C₂-6 Alkinylgruppe darstellen, die die Dreifachbindung(en) an beliebiger Stelle aufweist und unsubstituiert oder substituiert sein kann;

20

kann der Ausdruck "substituiert" oder Substituent eine beliebige Substitution durch eine oder mehrere, vorzugsweise eine oder zwei Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, ein- oder mehrwertige Acyl-, Alkanoyl-, Alkoxyalkanoyl- oder Alkoxyalkylgruppen darstellen; die vorstehenden Substituenten können wiederum eine oder mehrere, vorzugsweise jedoch keine, Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, ein- oder mehrwertige Acyl-, Alkanoyl-, Alkoxyalkanoyl- oder Alkoxyalkylgruppen als Seitengruppen aufweisen;

25 können organische Amine, Amide, Alkohole oder Säuren mit jeweils 8 bis 50 C-Atomen vorzugsweise mit 10 bis 20 C-Atomen die Formeln (Alkyl)₂N- oder Alkyl-NH-, -CO-N(Alkyl)₂ oder -CO-NH(Alkyl), -Alkyl-OH oder -Alkyl-COOH aufweisen.

30

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können trotz verlängerter Seitenkettenfunktion noch an das aktive Zentrum des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV und analoger Enzyme binden, werden aber nicht mehr aktiv durch den Peptidtransporter PepT1 transportiert. Die daraus resultierende

verminderte bzw. stark eingeschränkte Transportfähigkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen führt in idealer Weise zu einer lokalen, topischen Inhibierung der DP IV und analoger Enzyme.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können als Racemate oder als enantiomerenreine Verbindungen, vorzugsweise in der L-threo- oder L-allo-Form, bezogen auf A, vorliegen bzw. verwendet werden. (Muß es hier nicht A heißen?)

Ein lokaler Eingriff in die Regulation von Peptidhormonen durch topische Applikation von spezifischen DP IV-Inhibitoren bietet damit die Möglichkeit, durch enterale oder parenterale Gabe von DP IV-Inhibitoren verursachte systemische Nebenwirkungen zu vermeiden, da nur eine lokal begrenzte Hemmung der DP IV-Aktivität stattfindet. Systemische Regulationsprozesse bzw. Regulationsprozesse in anderen Geweben bleiben weitestgehend unbeeinflußt, da eine schnelle systemische Verteilung dieser Verbindungen vermieden wird.

Durch Verlängerung / Vergrößerung der Seitenkettenmodifikationen z.B. über eine Kohlenstoffanzahl von sieben C-Atomen hinaus, kann erfindungsgemäß also eine dramatische Reduktion der Transportierbarkeit erzielt werden (Tabelle 1). Die Beispiele in Tabelle 1 zeigen deutlich, daß mit zunehmender räumlicher Grösse der Seitenketten die Transportfähigkeit der Substanzen abnimmt. Durch die räumliche und sterische Vergrößerung der Seitenketten z.B. über die Atomengröße eines einfach substituierten Phenylrestes, Hydroxylaminrestes oder Aminosäurerestes hinaus, kann man erfindungsgemäß die Transportierbarkeit der Zielsubstanzen modulieren bzw. supprimieren.

Damit wird eine diskriminierende Beeinflussung der DP IV-Aktivität im lebenden Organismus ermöglicht.

Durch die Erfundung kann damit zum einen eine effektive Wirkung der Inhibitoren im zu behandelnden Gewebe erreicht werden, und zum anderen können durch lokal begrenzte, also topische Applikation von DP IV-Inhibitoren systemische Wirkungen der Inhibitoren weitestgehend vermieden werden. Damit wird eine effektive und nebenwirkungsarme Beeinflussung lokaler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse (Entzündungen, Psoriasis, Arthritis, Autoimmunerkrankungen, Allergien) erreicht.

Die Erfindung stützt sich auf folgende Tatsachen:

- Enteral bzw. parenteral, d. h. oral bzw. i.v. oder subkutan verabreichte DP IV-Inhibitoren verteilen sich systemisch und hemmen die DP IV und analoge Aktivitäten im gesamten Organismus.
- 5 • Eine Reihe von bioaktiven Peptidsubstraten der DP IV sind dagegen in die Regulation lokaler Signalkaskaden involviert (Chemotaxis, Entzündungen, Neurotransmission).
- Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen seitenkettenmodifizierten DP IV-Inhibitoren eine hohe inhibitorische Potenz, werden aber kaum bzw. nicht absorbiert und transportiert und führen damit nicht zu nachweisbaren systemischen Effekten.
- 10 Die Erfindung stellt also neue DP IV-Inhibitoren und eine neuartige Herangehensweise für die Anwendung der DP IV- Inhibitoren *in vivo* bereit. Entsprechende Inhibitoren lassen sich durch chemische Modifizierungen bzw. Formulierungen auf die Art der Anwendung anpassen. So wird z.B. durch voluminöse hydrophile Substitutionen an der Seitenkette eine systemische Verteilung erschwert bzw. vermieden.
- 15 Die Inhibitoren können in pharmazeutischen und kosmetischen Präparaten verabreicht werden.

Die topische Anwendung umfaßt dabei die lokale Anwendung der Inhibitoren durch direktes Aufbringen auf das zu behandelnde Gewebe (z.B. Haut, Wunden, Tumore) durch Salben, Cremes, Kosmetika, oder indirektes Aufbringen durch effektorhaltige Pflaster, Binden o. ä., durch Applikation in Körperteile (Mund, Nase, Ohren, Augen, Lunge) in Form von Tropfen, Sprays, Inhalaten o. ä., durch direkte Injektion in oder um das zu behandelnde Gewebe und durch Implantation von effektorhaltigen Materialien. Die topische Anwendung umfaßt weiterhin die orale oder anale Applikation schwer- bzw. nichtabsorbierbarer Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Sequenzen zur selektiven Beeinflussung der gastro-intestinalen DP IV.

25

Erfindungsgemäß werden insbesondere Verbindungen eingesetzt, in denen die Oligopeptide Kettenlängen von 3 bis 15, besonders bevorzugt von 4 bis 10 Aminosäuren aufweisen, und/oder die Polyethylenglykole mit Molmassen von mindestens 250 g/mol, vorzugsweise von mindestens 1500 g/mol und bis zu 15000 g/mol aufweisen, und/oder die gegebenenfalls substituierten organischen Amine, Amide, Alkohole, Säuren oder Aromaten mit mindestens 12 C-Atomen und vorzugsweise bis zu 30 C-Atomen aufweisen. Weiter werden pharmazeutische und kosmetische

Zusammensetzungen offenbart, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung gegebenenfalls in Kombination mit an sich üblichen Trägern oder Adjuvantien enthält.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzungen können zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidylpeptidase IV oder analoger Enzyme, insbesondere zur Prophylaxe oder Therapie von Haut- oder Schleimhauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen wie z.B. Psoriasis, Allergien, Arthritis, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

10 Die Verbindungen und pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzungen können als Salbe, Creme, Kosmetikum, Pflaster, Binde, Tropfen, Spray, Inhalat, Implantat oder Injektionslösung formuliert und eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Adjuvantien sind an sich bekannt.

15 Die Erfindung betrifft also die topische Anwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV sowie DP IV-analoger Enzymaktivitäten und DP IV-ähnlicher Proteine. Die topische Anwendung erlaubt eine lokale Modulation der Aktivitäten der obengenannten hochspezifischen Enzyme, die entscheidend an der Inaktivierung und Aktivierung biologisch aktiver Peptide (Chemokine, Substanz P, VIP, PHM, PACAP, Wachstumsfaktoren, u.a.) beteiligt sind.

20 Damit ist ein gezieltes Eingreifen in lokale immunologische Prozesse (Chemotaxis, Entzündungsprozesse, Autoimmunerkrankungen) und eine wirksame und gezielte Behandlung damit verbundener pathophysiologischer und physiologischer Prozesse (Psoriasis, Parodontitis, Arthritis, Allergien, Entzündungen) möglich. Die Erfindung ermöglicht eine leichte

25 Anwendbarkeit der Inhibitoren in hohen lokalen Konzentrationen.

Durch die geringe systemische Belastung mit den entsprechenden Effektoren wird eine Beeinflussung des Inkretinsystems sowie der systemischen Immunantwort vermieden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Wirkung von Seitenkettenmodifizierten Glutamylthiazolidinen als schwer transportbare DP IV-Inhibitoren

5 Es wurden Seitenkettenmodifizierte Glutamylthiazolidine der Struktur H-Glu(X)-Thia synthetisiert, wobei als X Polyethylenglycol oder Glycinoligomere verschiedener Kettenlänge verwendet wurden (Synthesbeschreibung siehe Methode A). Von diesen Derivaten wurden die Bindungseigenschaften am und die Transportfähigkeit durch den Peptidtransporter PepT1 untersucht sowie die K_i -Werte gegenüber DP IV bestimmt (Tabelle 1).

10 Überraschenderweise konnte festgestellt werden, daß die Seitenkettenmodifikationen die Bindungs-Eigenschaften an der Verbindung nur in geringem Maße verändern. Dagegen wird die Transportfähigkeit der Inhibitoren durch den Peptidtransporter durch die Seitenkettenmodifizierung drastisch herabgesetzt.

Damit eignen sich diese DP IV-Inhibitoren hervorragend, um eine lokal begrenzte (topische)

15 Hemmung der DP IV im Organismus zu erreichen.

Tabelle 1: Transportierbarkeit und Inhibitorkonstanten von ausgewählten DP IV-Inhibitoren.

Verbindung	EC50 (mM) ¹	I_{max} (nA) ²	K_i (Mol/l) ³
<i>Aminosäurethiazolidide</i>			
H-Ile-Thia	0,98	25 ± 8	1,3e-7 ± 11,1%
H-Glu-Thia	1,1	35 ± 13	6,1e-7 ± 11,4%
<i>Seitenkettenmodifizierte Glutamylthiazolidine</i>			
H-Glu(NHOH)-Thia	3,18	42 ± 11	1,7e-6 ± 8,6%
H-Glu(Gly ₃)-Thia	8,54	n.n. ⁴	1,92e-7 ± 8,4%
H-Glu(Gly ₅)-Thia	>10	n.n. ⁴	9,93e-8 ± 11,4%
H-Glu(PEG)-Thia	>10	n.n. ⁴	3,11e-6 ± 9,8%

1 Effektive Konzentrationen der Verbindungen, die die Bindung von ³H-D-Phe-Ala (80mM) an PepT1-exprimierende *P. pastoris*-Zellen zu 50% inhibieren (EC₅₀-Werte)

2 Transportverhalten an PepT1-exprimierenden Oocyten von *X. laevis* - mittels Zwei-Elektroden-Spannungclamp-Methode, I = durch den Transport generierte Einwärtsströme

3 Inhibitorkonstanten für die kompetitive Hemmung von gereinigter Nieren-DP IV durch die Beispielverbindungen

4 nicht nachweisbar

Beispiel 2: Effekt von oral applizierten DP IV-Inhibitoren auf Aktivität der Serum-DPIV

Die Hemmung der Plasma DP IV (systemische Wirkung) wurde nach oraler Applikation von seitenkettenmodifizierten DP IV Inhibitoren ($5\mu\text{M}/300\text{mg}$ Ratte) im Vergleich zu unmodifizierten Inhibitoren an gesunden Wistar-Ratten untersucht.

Obwohl die Inhibitoren annähernd gleiche K_i -Werte gegenüber DP IV besitzen (Tabelle 1) wird die Plasma-DP IV durch die neuartigen seitenkettenmodifizierten Inhibitoren deutlich langsamer und insgesamt wesentlich weniger gehemmt. Das heißt, daß diese Inhibitoren deutlich schlechter oder gar nicht aus dem Darm absorbiert werden. Insbesondere im Falle des Glu(Gly)₅-Thia ist keine systemische Wirkung des oral applizierten Wirkstoffes nachweisbar.

Damit können diese Inhibitoren als Leitstruktur für die Synthese neuartiger topisch applizierbarer DP IV-Inhibitoren ohne systemische Wirkung fungieren.

*Beispiel 3: Synthese von seitenkettenmodifizierten Inhibitoren der DP IV*15 **3.1 Synthese des Boc-Glu-Thia**

Umsetzung von Boc-Glu(OMe)-OH mit Thia*HCl nach Methode B (Methoden siehe Abschnitt 3.4), Verseifung des Boc-Glu(OMe)-Thia nach Methode G

Tabelle 2 Analytische Daten des Boc-Glu-Thia

Verbindung	Summenformel M _r Syntheseme- thode Ausbeute	MS [M+H] ⁺ DC:R _f /Sys- tem F _p	[α] ²⁰ _D , Konzen- tration LM	Elementarana- lyse (ber./gef.) %	HPLC R _t [min]/ System
Boc-Glu-Thia	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₅ S 318,38 B + G 62%	319,5 0,52 / A ¹ 0,42 / B ¹ 115-118°C	-3,1 c = 1 Methanol	C:49,04/48,89 H:6,96/6,82 N:8,80/8,59	13,93 / A ²

Dünnschichtchromatographie

20 System A: Chloroform/Methanol 90:10
System B: Benzen/Aceton/Essigsäure 25:10:0,5
System C: n-Butanol/EE/Essigsäure/H₂O 1:1:1:1

² HPLC-Trennbedingungen

25 Säule: Nucleosil C-18, 7μ, 250mm x 21mm
Eluent: Isokratisch, 40% ACN/Wasser/0,1% TFA
Fluß: 6ml/min
λ = 220nm

3.2 Seitenkettenmodifizierte Boc-Glutamylthiazolidine

Boc-Glu-Thia wurde an der γ -Carbonsäurefunktion durch die Einführung verschieden großer Reste modifiziert. Diese Reste wurden über ihre Aminogruppe durch Ausbildung einer Amid-

5 bindung an die γ -Carbonsäurefunktion gekuppelt. Dabei kamen je nach Rest verschiedene Kupplungsverfahren zum Einsatz.

Folgende Aminokomponenten wurden mit der angegebenen Methode an Boc-Glu-Thia geknüpft:

Aminokomponente	Kupplungsmethoden (siehe Abschnitt 3.4)	Ausbeuten
Polyethylenglycolamin ($M_r \approx 8000$)	C	93%
H-Gly-Gly-OH	D + E	49%
H-Gly-Gly-Gly-Gly-OH	D + E	86%

Die Aufreinigung der Reaktionsprodukte weicht in 2 Fällen von der allgemeinen Synthesebe-

10 schreibung ab.

Boc-Glu(Gly₅)-Thia

Das Produkt fällt bereits im Ansatz beim Rühren über Nacht aus, wird anschließend abfiltriert und mit 0,1n HCl und reichlich Wasser gewaschen. Danach wird es über P₄O₁₀ i. Vak. getrocknet.

15 *Boc-Glu(PEG)-Thia*

Abweichend von der allgemeinen Vorschrift werden die Ausgangsstoffe der Synthese in einem 500fachen Überschuß an DMF gelöst. Nach Reaktionsende wird das DMF i.Vak. vollständig entfernt und der Rückstand in viel Methanol gelöst. Nach Überschichtung mit Ether fällt das Produkt zusammen mit nicht umgesetztem PEG aus. Die Feinreinigung erfolgte durch präparative HPLC-Trennung an einer Gelfiltrationssäule (Pharmazia, Sephadex G-25, 90 μ m, 260mm-100mm).

Trennbedingungen: Eluent: Wasser, Fluß: 5ml/min, $\lambda = 220\text{nm}$

Tabelle 3 Synthesedaten der seitenkettenmodifizierten Boc-Glutamylthiazolidine

Verbindung	Summenformel M _r Ausbeute	MS [M+H] ⁺ DC/R _f /System F _p	[α] ²⁰ _D , Konzentration LM	Elementarana- lyse (ber./gef.) %	HPLC- R _t [min]/ System
Boc-Glu(Gly ₃)-Thia	C ₁₉ H ₃₁ N ₅ O ₈ S 489,54 49%	490,5		C:46,62 H:6,38 N:14,31	
Boc-Glu(Gly ₅)-Thia	C ₂₃ H ₃₇ N ₇ O ₁₀ S 603,64 86%	604,5 0,09 / C Zers. ab 202°C	n. b.	C:45,76/45,60 H:6,18/6,11 N:16,24/16,5 6	11,93 / A ²
Boc-Glu(PEG)-Thia		≈8000 (Mas- senschwer- punkt) 52-53°C	n. b.	n. b.	n.b.

² HPLC-Trennbedingungen

Säule: Nucleosil C-18, 7μ, 250mm x 21mm

5 Eluent: Isokratisch, 40% ACN/Wasser/0,1% TFA

Fluß: 6ml/min

λ = 220nm

3.3 Seitenkettenmodifizierte Glutamylthiazolidine

10 Von den in Tabelle 3 beschriebenen Verbindungen wurden nach Methode F die N-terminalen Boc-Schutzgruppen abgespalten. Die mit Gly-Derivaten modifizierten Substanzen wurden durch präparative HPLC-Trennung aufgereinigt, und liegen als Trifluoracetate vor. Das H-Glu(PEG)-Thia wurde wie die Boc-geschützte Vorstufe an einer Gelfiltrationssäule gereinigt.

Tabelle 4 Synthesedaten der seitenkettenmodifizierten Glutamylthiazolidine

Verbindung	Summenformel M _r Ausbeute	MS [M+H] ⁺ DC/R _f /Sys- tem F _p	[α] ²⁰ _D , Kon- zentration LM	Elementarana- lyse (ber./gef.) %	HPLC R _t [min]/ System
H-Glu(Gly ₃)-Thia *TFA	C ₁₆ H ₂₄ N ₅ O ₈ SF ₃ 503,45 94%	503,45 0,32 / C 91-94°C	+4,1 c = 1 Methanol	C:38,17/37,56 H:4,80/4,78 N:13,91/13,4 3	7,84 / C ³
H-Glu(Gly ₅)-Thia *TFA	C ₂₀ H ₃₀ N ₇ O ₁₀ SF ₃ 617,55 98%	617,55 0,25 / C 105-107°C	n. b.	C:38,90/38,82 H:4,90/4,79 N:15,88/15,3 9	8,22 / C ³
H-Glu(PEG)-Thia *HCl		~8000 (Mas- senschwer- punkt) 92%	n. b.	n. b.	n. b.

³ HPLC-Trennbedingungen

Säule: Nucleosil C-18, 7μ, 250mm x 21mm

5 Eluent: ACN/Wasser/0,1% TFA

Gradient: 20% ACN → 90% ACN in 30min

Fluß: 6ml/min

λ = 220nm

n.b. – nicht bestimmt oder nicht bestimmbar

10

3.4 Allgemeine Synthesevorschriften

Methode A: Peptidbindungs knüpfung mittels Mischanhydridmethode mit CAIBE als Aktivierungsreagenz

10mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid werden in 20ml absolutem THF gelöst.

15

Die Lösung wird auf -15°C ± 2°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10mmol N-MM und 10mmol Chlorameisensäureisobutylester zugegeben, wobei streng auf die Einhaltung des angegebenen Temperaturbereichs geachtet wird. Nach ca 6min werden 10mmol der Aminokomponente zugesetzt. Handelt es sich bei der Aminokomponente um ein Salz, wird der Reaktionsansatz anschließend mit weiteren 10mmol N-MM versetzt. Danach wird die Reaktionsmis-
schung 2h in der Kälte und über Nacht bei RT gerührt.20 Der Reaktionsansatz wird einrotiert, in EE aufgenommen, mit mit 5%iger KH₂SO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über NaSO₄ getrocknet.

Nach der Entfernung des LM i. Vak. wird die Verbindung aus EE/Pentan umkristallisiert.

Methode B: Peptidbindungsknüpfung mittels Mischanhydridmethode mit Pivalinsäurechlorid als Aktivierungsreagenz

10mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid werden in 20ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Röhren je 10mmol N-MM und

5 10mmol Pivalinsäurechlorid zugegeben, wobei streng auf die Einhaltung des angegebenen Temperaturbereichs geachtet wird. Nach ca 6min wird der Ansatz auf -15°C abgekühlt und es werden nach Erreichen der tieferen Temperatur 10mmol der Aminokomponente zugesetzt. Handelt es sich bei der Aminokomponente um ein Salz, wird der Reaktionsansatz anschließend mit weiteren 10mmol N-MM versetzt. Danach wird die Reaktionsmischung 2h in der Kälte und über

10 Nacht bei RT gerührt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei *Methode A*.

Methode C: Peptidbindungsknüpfung mit TBTU als Aktivierungsreagenz

10mmol der N-terminal geschützten Aminosäure bzw. Peptid und 10mmol der C-terminal geschützten der Aminokomponente werden in 20ml absolutem DMF gelöst. Die Lösung wird auf

15 0°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Röhren je 10mmol DIPEA und 10mmol TBTU zugegeben. Der Ansatz wird ein Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wird vollständig i. Vak. entfernt und das Produkt wie unter *Methode A* beschrieben aufgearbeitet.

20 ***Methode D: Darstellung eines Aktivesters (N-Hydroxysuccinimid-Ester)***

10mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid und 10mmol N-Hydroxysuccinimid werden in 20ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt, und es werden 10mmol Diyclohexylcarbodiimid unter Röhren zugegeben. Der Reaktionsansatz wird weitere 2h bei 0°C und anschließend bei RT über Nacht gerührt. Der entstandene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das LM i. Vak entfernt und das zurückbleibende Produkt aus EE/Pentan umkristallisiert.

Methode E: Amidbindungsknüpfung mit N-Hydroxysuccinimid-Estern

10mmol der C-terminal ungeschützten Aminokomponente werden in einer NaHCO₃-Lösung (20mmol in 20ml Wasser) vorgelegt. Zu dieser Lösung werden bei RT unter Röhren langsam 10mmol des in 10ml Dioxan gelösten N-terminal geschützten N-Hydroxysuccinimidesters zuge tropft. Der Reaktionsansatz wird weiter über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel

i. Vak. entfernt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei *Methode A*

Methode F: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

1mmol Boc-geschütztes Aminosäurepyrrolidid, -thiazolidid oder Peptid wird mit 3ml 1,1n
5 HCl/Eisessig (*Methode F1*) oder 3ml 1,1n HCl/Dioxan (*Methode F2*) oder 3ml 50%ige TFA in
DCM (*Methode F3*) versetzt. Die Abspaltung bei RT wird mittels DC verfolgt. Nach Beendi-
gung der Reaktion (ca 2h) wird die Verbindung als Hydrochlorid mit absolutem Diethylether
ausgefällt, abgesaugt und i. Vak. über P₄O₁₀ getrocknet. Das Produkt wird aus Methanol/Ether
umkristallisiert oder umgefällt.

10 ***Methode G: Verseifung***

1mmol Peptidmethylester wird in 10ml Aceton und 11ml 0,1M NaOH-Lösung gelöst und bei RT
gerührt. Der Verlauf der Verseifung wird mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion
wird das Aceton i. Vak. entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wird mit konzentrierter
KH₂SO₄-Lösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 2-3 angesäuert. Anschließend extra-
15 hiert man das Produkt mehrmals mit EE und wäscht die vereinigten Essigesterfraktionen mit
gesättigter NaCl-Lösung, trocknet über NaSO₄ und entfernt i. Vak. das Lösungsmittel. Die Kri-
stallisation erfolgt aus EE/Pentan.

Abbildung 1:

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der prozentualen Hemmung der Plasma-
DP IV-Aktivität nach oraler Applikation von 5µMol Inhibitor pro 300g Ratte
(n=2)

Literaturverzeichnis

5 Ansorge, S., Schön, E., and Kunz, D. (1991). Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications. *Biomed.Biochim.Acta* **50**, 799-807.

Ansorge, S., Bühlung, F., Hoffmann, T., Kähne, T., Neubert, K., and Reinhold, D. (1995). *Dipeptidylpeptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response* (Fleischer, B., Ed.) Springer-Verlag, Heidelberg. 163-184.

10 Augustyns, K., Bal, G., Thonus, G., Belyaev, A., Zhang, X. M., Bollaert, W., Lambeir, A. M., Durinx, C., Goossens, F., and Haemers, A. (1999). The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors. *Curr Medicinal Chem* **6**, 311-327.

Buntrock, P., Neubert, K., Kohl, A., Moch, C., Born, I., Demuth, H.-U., and Barth, A. (1988). Stimulation and inhibition of wound healing process using short-chain peptides. *Biol.Zent.bl.* **107**, 87-92.

15 Demuth, H.-U., Heins, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV*, Fleischer, Ed., R.G.Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1, 1995.

Demuth, H.-U., McIntosh, C. H. S., Rosche, F., Pauly, R. P., Pederson, R. A., and Schmidt, J. Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels in Säugern. DE 196 16 486.9

20 Fujita, K., Hagihara, M., Nagatsu, T., Iwata, H., and Miura, T. (1992). The activity of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice immunized with type II collagen. *Biochem.Med.Metab.Biol.* **48**, 227-234.

Gomez, S., Gluschanek, P., Lepage, A., and Cohen, P. (1988). Relationship between endo- and exopeptidases in a processing enzyme system: activation of an endoprotease by the aminepeptidase B-like activity in somatostatin-28 convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5468-5472.

25 Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C.E., Stein, H., and Fleischer, B. (1990). The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J.Immunol.* **144**, 2908-2914.

30 Hegen, M., Mittrücker, H.-W., Hug, R., Demuth, H.U., Neubert, K., Barth, A., and Fleischer, B. (1993). Enzymatic activity of CD26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells. *Immunobiol.* **189**, 483-493.

Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., and Sugita, H. (1989). Putative N-terminal splitting enzyme of amyloid A4 peptides is the multicatalytic proteinase, ingensin, which is widely distributed in mammalian cells. *FEBS Lett* **257**, 388-392.

35 Kameoka, J., Sato, T., Torimoto, Y., Sugita, K., Soiffer, R.J., Schlossman, S.F., Ritz, J., and Morimoto, C. (1995). Differential CD26-mediated activation of the CD3 and CD2 pathways after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **85**, 1132-1137.

Kähne, T., Neubert, K., and Ansorge, S. (1995). Enzymatic activity of DAPI / CD26 is involved in PMA-induced hyperphosphorylation of p56^{lck}. *Immunol.Lett.* **46**, 189-193.

5 Kaspari, A., Diefenthal, T., Grosche, G., Schierhorn, A., Demuth, H.-U., Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease cleavage by proline-specific peptidases, *Protein Struct Mol Enzym.*, **147**, 1996

Kessler, H. (1982). Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* **94**, 509

Kirschke, H., Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**, 1581-1643.

10 Kohl, A., Volk, H.D., Diezel, W., Buntrock, P., and Diamantstein, T. (1989). The dipeptide Lys-Pro restores the diminished wound healing following treatment with anti-T-helper cell monoclonal antibody. *Int.J.Immunopharmacol.* **11**, 237-240.

Kohl, A., Volk, H.D., Buntrock, P., Kohl, G., Diamantstein, T., and von Baehr, R. (1991). The role of dipeptidylpeptidase IV positive T cells in wound healing and angiogenesis. *Agents Actions* **32**, 125-127.

15 Kräusslich, H.-G. and Wimmer, E. (1987). Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 701

Kubota, T., Flentke, G.R., Bachovchin, W.W., and Stollar, B.D. (1992). Involvement of dipeptidyl peptidase IV in an in vivo immune response. *Clin.Exp.Immunol.* **89**, 192-197.

Küllertz, G. and Boigk, J. (1986). Dipeptidyl peptidase IV activity in the serum and synovia of patients with rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* **45**, 52-56.

20 Levy, M.T., McCaughan, G.W., Abbott, C.A., Park, J.E., Cunningham, A.M., Müller, E., Rettig, W.J., Gorell, M.D., Fibroblast Activation Protein: A Cell Surface Dipeptidyl Peptidase and Gelatinase Expressed by Stellate Cells at the Tissue Remodelling Interface in Human Cirrhosis *Hepatology*, **29**, 1999, 1768-1778.

Niedermeyer, J., Enenkel, B., Park, J. E., Lenter, M., Rettig, W. J., Damm, K., and Schnapp, A. (1998). Mouse fibroblast-activation protein - Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur J Biochem* **254**, 650-654.

25 Nelson, P.J. and Krensky, A.M. (1998). Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* **10**, 265-270.

Novelli, M., Savoia, P., Fierro, M. T., Verrone, A., Quaglino, P., and Bernengo, M.G. (1996). Keratinocytes express dipeptidyl-peptidase IV (CD26) in benign and malignant skin diseases. *Br J Dermatol* **134**, 1052-1056.

30 Pauly, R. P., Demuth, H. U., Rosche, F., Schmidt, J., White, H. A., Lynn, F., McIntosh, C. H. S., and Pederson, R. A. (1999). Improved glucose tolerance in rats treated with the dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibitor ile-thiazolidide. *Metabolism* **48**, 385-389.

35 Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A., and Demuth, H. U. (1996). Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and gluca-

gon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry - A novel kinetic approach. *J Biol Chem* 271, 23222-23229.

5 Proost, P., De Meester, I., Schols, D., Struyf, S., Lambeir, A.M., Wuyts, A., Opdenakker, G., De Clercq, E., Scharpf, S., and Van Damme, J. (1998a). Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J Biol Chem* 273, 7222-7227.

10 Proost, P., Struyf, S., Schols, D., Durinx, C., Wuyts, A., Lenaerts, J.P., De Clercq, E., De Meester, I., and Van Damme, J. (1998b). Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1alpha. *FEBS Lett* 432, 73-76.

15 Proost, P., Struyf, S., Schols, D., Opdenakker, G., Sozzani, S., Allavena, P., Mantovani, A., Augustyns, K., Bal, G., Haemers, A., Lambeir, A.M., Scharpf, S., Van Damme, J., and De Meester, I. (1999). Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/ dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. *J Biol Chem* 274, 3988-3993.

Raynaud, F., Bauvois, B., Gerbaud, P., and Evain Brion, D. (1992). Characterization of specific proteases associated with the surface of human skin fibroblasts, and their modulation in pathology. *J Cell Physiol*. 151, 378-385.

20 Reinhold, D., Bank, U., Buhling, F., Tager, M., Born, I., Faust, J., Neubert, K., and Ansorge, S. (1997). Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. *Immunol Lett* 58, 29-35.

25 Reinhold, D., Hemmer, B., Gran, B., Born, I., Faust, J., Neubert, K., McFarland, H. F., Martin, R., and Ansorge, S. (1998). Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+T cell clones. *J Neuroimmunol* 87, 203-209.

Reinhold, D., Hemmer, B., Steinbrecher, A., Born, I., Faust, J., Neubert, K., Brocke, S., Martin, R., Ansorge, S., Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26): Role in T cell activation and autoimmune disease. *Biol. Chem.* 379, S 69, 1998.

30 Scholzen, T., Armstrong, C.A., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Olerud, J.E., and Ansel, J.C. (1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7, 81-96.

35 Shioda, T., Kato, H., Ohnishi, Y., Tashiro, K., Ikegawa, M., Nakayama, E.E., Hu, H., Kato, A., Sakai, Y., Liu, H., Honjo, T., Nomoto, A., Iwamoto, A., Morimoto, C., and Nagai, Y. (1998). Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6331-6336.

Tanaka, T., Kameoka, J., Yaron, A., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1993). The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4586-4590.

Tanaka, S., Murakami, T., Horikawa, H., Sugiura, M., Kawashima, K., and Sugita, T. (1997). Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Immunopharmacol* 19, 15-24.

5 Tanaka, S., Murakami, T., Nonaka, N., Ohnuki, T., Yamada, M., and Sugita, T. (1998). Anti-arthritic effects of the novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225. *Immunopharmacology* 40, 21-26.

Vanhooft, G., Goossens, F., De Meester I., Hendriks, D., and Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9, 736-744.

Wallengren, J. (1997). Vasoactive peptides in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2, 49-55.

10 Yaron, A. and Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* 28(1), 31-38.

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel A-C, wobei

5



A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist,

B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe der

10 Seitenkette von A gebunden ist, nämlich

- Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren außer Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren oder
- Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol,

15

C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydropolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß A eine α -Aminosäure ist.

20

3. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß A eine natürliche α -Aminosäure ist.

25

4. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure Threonin, Tyrosin, Serin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Cystein ist.

5. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Kettenlängen von 3 bis 15 Aminosäuren aufweisen.

30

6. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Homopolymere, Copolymeren oder Blockcopolymere sind.

7. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyethylenglykole Molmassen von mindestens 250 g/mol aufweisen.

5 8. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, oder Cyanopyrrolidin gruppe ist.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit an sich üblichen Trägern oder Adjuvantien enthält.

10 10. Kosmetische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gegebenenfalls in Kombination mit an sich üblichen Trägern oder Adjuvantien enthält.

15 11. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl-Peptidase IV oder analoger Enzyme.

20 12. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Prophylaxe oder Therapie von Haut- oder Schleimhauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen.

25 13. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Prophylaxe oder Therapie von Entzündungen, Psoriasis, Allergien, Arthritis, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen.

14. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 als Salbe, Creme, Kosmetikum, Pflaster, Binde, Tropfen, Spray, Inhalat, Implantat oder Injektionslösung.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, die

mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formeln A-C, wobei

5

B

A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist,

10 B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren, Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, gegebenenfalls substituierte organische Amine, Amide, Alkohole, Säuren oder Aromaten mit 8 bis 50 C-Atomen,

15 C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt,

sowie

20 mindestens ein auf den Wirkort abgestimmtes übliches Adjuvans enthält.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß A eine α -Aminosäure ist.

25 17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß A eine natürliche α -Aminosäure ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure Threonin, Tyrosin, Serin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure, 30 Glutaminsäure oder Cystein ist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Kettenlängen von 3 bis 15 Aminosäuren aufweisen.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Homopolymere, Copolymere oder Blockcopolymere sind.

5 21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyethylenglykole Molmassen von mindestens 250 g/mol aufweisen.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin,- oder Cyanopyrrolidin gruppe ist.

10 23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Salbe, Creme, Kosmetikum, Pflaster, Binde, Tropfen, Spray, Inhalat, Implantat oder Injektionslösung eingesetzt wird.

15 24. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Kombination mit an sich üblichen Trägern eingesetzt wird.

25. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl-Peptidase IV oder analoger Enzyme.

20 26. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Prophylaxe oder Therapie von Haut- oder Schleimhauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen.

25 27. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Prophylaxe oder Therapie von Entzündungen, Psoriasis, Parodontitis, Allergien, Arthritis, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen.

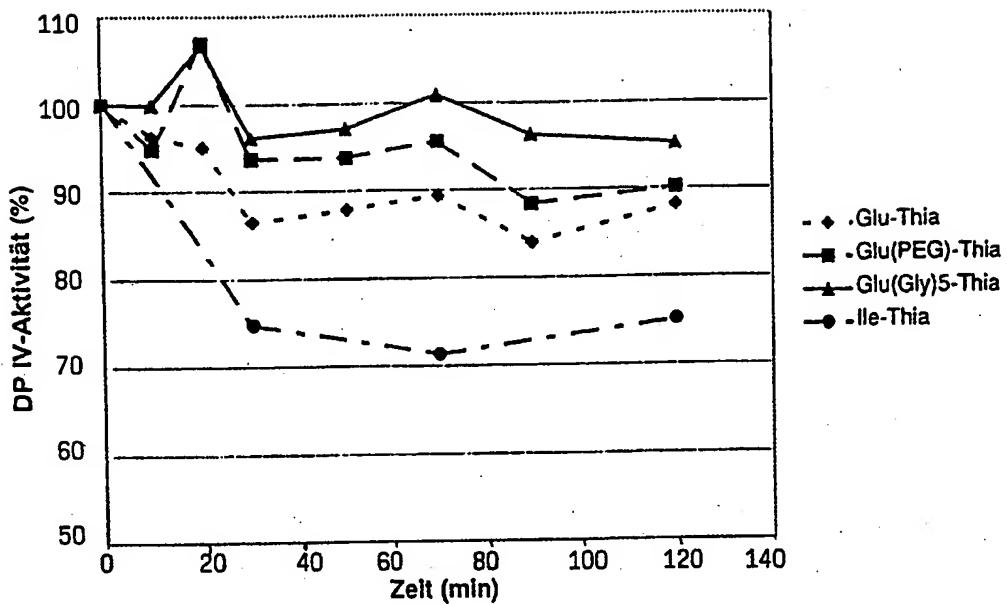


Fig. 1: Systemische Wirkung oral applizierter DP IV-Inhibitoren an gesunden Wistar-Ratten.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14318 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 5/037, 7/02, C07D 277/04, A61K 31/425, 38/06, A61P 3/00

(74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08118

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. August 2000 (20.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 40 130.6 24. August 1999 (24.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PROBIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE). HOFFMANN, Torsten [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06114 Halle (DE). HEISER, Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 1. November 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Titel: NEW EFFECTORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV FOR TOPICAL USE

(54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN DER DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ZUR TOPISCHEN ANWENDUNG

A-C

①

B

(57) Abstract: The invention relates to compounds of general formula (I), wherein A represents an amino acid with at least one functional group in the side chain; while B is a chemical compound covalently bound to a functional group of the side chain of A, namely oligopeptide with a chain length of up to 20 amino acids with the exception of glycine homopolymers which have up to 6 glycine monomers or polyethylene glycols with molar masses of up to 20000 g/mole; C represents a thiazolidine, pyrrolidine, cyanopyrrolidine, hydroxyproline, dehydroproline or piperidine group which is amide bonded. These compounds can be used to topically influence the activity of dipeptidyl Peptidase IV.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wobei A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist, B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an eine funktionelle Gruppe der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptid mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren außer Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren oder Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidinogruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt. Diese Verbindungen können zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl Peptidase IV eingesetzt werden.

WO 01/14318 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 00/08118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	C07K5/037	C07K7/02	C07D277/04	A61K31/425
A61P3/00				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 34538 A (BORLOO MARIANNE JEAN FRIEDA ; GOOSSENS FILIP JOZEF ANNY (BE); HAEME) 21 December 1995 (1995-12-21) page 14, line 30 -page 15, line 6; claim 1	1,15
X	WO 95 15309 A (FERRING BV ; JENKINS PAUL D (GB); JONES D MICHAEL (GB); SZELKE MICH) 8 June 1995 (1995-06-08) claims; examples 3,4	1,15
P,A	DE 198 26 972 A (ANSORGE SIEGFRIED ; UNIV HALLE WITTENBERG (DE); UNIV MAGDEBURG TECH) 23 December 1999 (1999-12-23) claims; examples	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

23 May 2001

01/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 00/08118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9534538 A	21-12-1995	AU	2790895 A	05-01-1996
		EP	0764151 A	26-03-1997
		US	6090786 A	18-07-2000
WO 9515309 A	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
		AU	8421998 A	12-11-1998
		CA	2178066 A	08-06-1995
		CN	1141033 A	22-01-1997
		CZ	9601595 A	15-01-1997
		EP	0731789 A	18-09-1996
		FI	962315 A	05-08-1996
		HU	76274 A	28-07-1997
		JP	9509921 T	07-10-1997
		NO	962269 A	30-07-1996
		PL	314838 A	30-09-1996
		US	6201132 B	13-03-2001
		US	5939560 A	17-08-1999
		ZA	9409525 A	02-08-1995
DE 19826972 A	23-12-1999	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Jes Aktenzeichen
PCT/EP 00/08118

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	C07K5/037	C07K7/02	C07D277/04	A61K31/425	A61K38/06
A61P3/00					

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K A61K C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 34538 A (BORLOO MARIANNE JEAN FRIEDA ; GOOSSENS FILIP JOZEF ANNY (BE); HAEME) 21. Dezember 1995 (1995-12-21) Seite 14, Zeile 30 -Seite 15, Zeile 6; Anspruch 1	1,15
X	WO 95 15309 A (FERRING BV ; JENKINS PAUL D (GB); JONES D MICHAEL (GB); SZELKE MICH) 8. Juni 1995 (1995-06-08) Ansprüche; Beispiele 3,4	1,15
P,A	DE 198 26 972 A (ANSORGE SIEGFRIED ; UNIV HALLE WITTENBERG (DE); UNIV MAGDEBURG TECH) 23. Dezember 1999 (1999-12-23) Ansprüche; Beispiele	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

23. Mai 2001

01/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. ja Aktenzeichen
PCT/EP 00/08118

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9534538 A	21-12-1995	AU	2790895 A	05-01-1996
		EP	0764151 A	26-03-1997
		US	6090786 A	18-07-2000
WO 9515309 A	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
		AU	8421998 A	12-11-1998
		CA	2178066 A	08-06-1995
		CN	1141033 A	22-01-1997
		CZ	9601595 A	15-01-1997
		EP	0731789 A	18-09-1996
		FI	962315 A	05-08-1996
		HU	76274 A	28-07-1997
		JP	9509921 T	07-10-1997
		NO	962269 A	30-07-1996
		PL	314838 A	30-09-1996
		US	6201132 B	13-03-2001
		US	5939560 A	17-08-1999
		ZA	9409525 A	02-08-1995
DE 19826972 A	23-12-1999	KEINE		

BLANK PAGE